UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise da variação na concentração dos ácidos clorogênicos diante de diferentes tratamentos pós-coleta

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Eduarda Antunes Moreira

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 02/10/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

MOREIRA, E. A. **Análise da variação na concentração dos ácidos clorogênicos diante de diferentes tratamentos pós-coleta.** 2017. 228f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Considerando que diversas atividades biológicas dos ácidos clorogênicos já foram descritas na literatura, uma melhor compreensão da biossíntese e do acúmulo desses polifenóis nas plantas está diretamente vinculada aos parâmetros de qualidade de fitoterápicos. Este trabalho teve o objetivo de monitorar a variação na concentração de metabólitos secundários do grupo dos ácidos clorogênicos no tecido foliar de diversas espécies diante de diferentes tratamentos pós-coleta. Este monitoramento foi realizado através da quantificação das substâncias por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em sequência (CLUE-EM/EM). Na primeira fase do estudo, foram coletadas folhas de cada espécie selecionada para o estudo (Caju - *Anacardium occidentale* L.; Graviola - *Annona muricata* L.; Pata-de-Vaca - *Bauhinia variegata* L.; Limão - *Citrus limon* (L.) Burm. f.; Café - *Coffea arabica* L.; Pitanga - *Eugenia uniflora* L.; Alecrim - *Rosmarinus officinalis* L., e Jambolão - *Syzygium cumini* (L.) Skeels). As folhas foram submetidas a um processo de extração e os extratos obtidos foram analisados por CLAE-EM/EM. Foram encontradas nove substâncias monossubstituídas nas posições 3, 4 e 5 pertencentes aos subgrupos dos ácidos *p*-cumaroilquínicos, cafeoilquínicos e feruloilquínicos dos ácidos clorogênicos, além de ácidos dicafeoilquínicos. A identificação dos sinais cromatográficos foi realizada por meio dos padrões de fragmentação de cada composto. Na segunda fase do estudo, foram coletadas quatro folhas dos indivíduos em estudo. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido (para interrupção do metabolismo) em tempos diferentes: imediatamente após a coleta (T0), 30 min após a coleta (T0,5), 1 h após a coleta (T1) e 2 h após a coleta (T2). Este procedimento foi realizado uma vez por mês durante seis meses. Em outro momento foram retiradas seis folhas de três indivíduos de espécies selecionadas (Alecrim, Pitanga, Pata-de-Vaca, Limão e Café) e cada folha foi congelada nos tempos T0 (imediatamente após a coleta), T6 (6 h após a coleta), T12 (12 h após a coleta), T24 (24 h após a coleta), T48 (48 h após a coleta) e Ts (após secagem das folhas – aproximadamente 30 dias após a coleta). O material coletado foi extraído e analisado por CLUE-EM/EM, no modo MRM. O método analítico quantitativo foi validado, considerando os parâmetros de linearidade, exatidão e precisão. As concentrações dos ácidos clorogênicos em estudo não apresentaram um padrão de variação que se relacione com os tempos de tratamento ou um aumento linear nas respostas dentro do intervalo de 2 h após o início do catabolismo do tecido. As amostras com tempos de tratamento mais longo, por sua vez, apresentaram aumento significativo de diversos compostos nas folhas que não tiveram seu metabolismo interrompido 30 dias após a coleta. Este acúmulo de ácidos clorogênicos corrobora a hipótese de que o aumento da concentração destes compostos pode estar relacionado ao catabolismo de polímeros fenólicos de maior massa.

Palavras-chave: Fenilpropanoides, Metabolismo, Plantas Medicinais

ABSTRACT

MOREIRA, E. A. **Analysis of the variation on chlorogenic acids' concentration towards different post-harvest treatments.** 2017. 228f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Considering that diverse chlorogenic acids' biological activities have been described, a better understanding of their biosynthesis and accumulation is closely related to phytotherapeutics' quality parameters. This research aimed to monitor the variation on the concentration of secondary metabolites from the chlorogenic acids' group on the leaf's tissue of diverse species, towards different post-harvest treatments. The monitoring was performed through the quantification of the compounds by UPLC-MS/MS. On the first phase of the project, leaves from each selected species (Cashew - *Anacardium occidentale* L.; Soursop - *Annona muricata* L.; Pata-de-Vaca - *Bauhinia variegata* L.; Lemon - *Citrus limon* (L.) Burm. f.; Coffee - *Coffea arabica* L.; Cherry - *Eugenia uniflora* L.; Rosemary - *Rosmarinus officinalis* L., and Jambolan - *Syzygium cumini* (L.) Skeels) were harvested. This material was submitted to an extraction process, and the obtained extracts were analyzed by HPLC-MS/MS. Nine substances were found, monosubstituted on positions 3-, 4- and 5-, belonging to the subgroups of *p*-coumaroylquinic, caffeoylquinic and feruloylquinic acids, in addition to dicaffeoylquinic acids. The chromatographic signals' identification was preceded observing the fragmentation pattern of each compound. On the second phase of the study, four leaves were collected from each individual. The leaves were frozen with liquid nitrogen (to interrupt the metabolism) on different moments – immediately after the collection (T0), 30 min after de collection (T0,5), 1 h after the collection (T1) and 2 h after the collection (T2). This procedure happened once a month during six months. On August, 2016, a different collection was performed for a broader observation: six leaves were harvested from three individuals from selected species (Rosemary, Cherry, Pata-de-Vaca, Limon and Coffee), and each leaf was frozen on T0 (immediately after the collection), T6 (6 h after the collection), T12 (12 h after the collection), T24 (24 h after the collection), T48 (48 h after the collection) and Ts (after leaf's drying – approximately 30 days after collection). The harvested material was extracted and analyzed by UPLC-MS/MS, on MRM mode. The analytical method was validated for linearity, accuracy and precision. Chlorogenic acids' concentrations did not show a pattern of variation that related to the different treatments or a linear increase on response until 2 hours after the beginning of the tissue catabolism. The samples submitted to a broader treatment interval, however, showed a significant rise on the concentration of different compounds, on leaves that did not have their metabolism interrupted until 30 days after the collection. This accumulation of chlorogenic acids agrees with the hypothesis that the raise on the concentration of these substances can be related to the catabolism of polymeric phenols of higher mass.

Keywords: Phenylpropanoids, Metabolism, Medicinal plants

1. Introdução

1.1. Metabolismo Secundário e Relógio Circadiano

Metabólitos secundários são compostos que ocorrem naturalmente em vegetais e são sintetizados através de diferentes vias bioquímicas fortemente influenciadas por fatores externos bióticos e abióticos (Pavarini *et al.*, 2012). Estas substâncias químicas possuem pouca ou nenhuma função nos processos de fotossíntese, respiração celular, crescimento e desenvolvimento dos organismos. Ainda assim, geralmente se acumulam em diferentes tecidos (Crozier *et al.*, 2009) e desempenham importante função na adaptação da planta ao ambiente e na interação destes indivíduos com o ecossistema (Bourgau *et al.*, 2001).

A composição química dos tecidos das plantas pode sofrer alterações devido a uma variedade de fatores, como o genótipo de cada indivíduo, condições ambientais, a presença de herbívoros, etc. (Bowers & Stamp, 1993). Dentre os principais fatores externos que influenciam a produção de metabólitos secundários, podemos citar a temperatura, a disponibilidade hídrica, a intensidade de radiação UV, a disponibilidade de nutrientes no solo, a altitude, a poluição atmosférica, fatores mecânicos e ataque de patógenos. Além destes, os ciclos sazonais e circadianos também são determinantes na concentração e na natureza dos produtos de metabolismo encontrados no material vegetal (Fig. 1) (Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Pavarini *et al.*, 2012).

Acredita-se que os organismos apresentam um relógio circadiano endógeno devido ao fato de que muitas funções biológicas importantes ocorrem ritmicamente, com duração de aproximadamente 24 h. A persistência destes ritmos sob condições ambientais constantes demonstra um controle que busca sincronizar e potencializar processos celulares, fisiológicos e comportamentais, em antecipação a mudanças periódicas no meio ambiente de um organismo, proporcionando-lhes, portanto, vantagens adaptativas. A regulação temporal de funções biológicas é de fundamental importância em plantas, e pode ser avaliada em função dos inúmeros eventos fisiológicos que apresentam ritmicidade circadiana, pois estas devem responder *in situ* a mudanças em seu meio ambiente (Barak *et al.*, 2000; Harmer *et al.*, 2000; Anderson & Kay, 1996; Pavarini *et al.*, 2012).

Figura 1. Principais fatores externos que podem afetar o conteúdo de metabólitos secundários de uma planta. Figura retirada do periódico Química Nova (http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No2_374_25-RV05289.pdf) com a autorização da Diretoria da Sociedade Brasileira de Química.

O modelo conceitual clássico do relógio que origina esses ritmos circadianos compreende três componentes básicos – as rotas de entrada, o oscilador e as rotas de saída. O oscilador é o marca-passo do sistema, e é o responsável por gerar um ritmo circadiano autossustentável, entretanto, para ter significância biológica, o período do ritmo deve ser sincronizado com o ambiente externo. Assim sendo, as rotas de entrada traduzem sinais temporais do meio ambiente para o oscilador. Estes sinais vêm mais comumente das transições diárias claro-escuro ou de mudanças na temperatura, mas outros sinais ambientais como o embebecimento de sementes também podem ajustar o relógio. Completando o modelo de relógio circadiano estão as rotas de saída, que estabelecem uma ligação entre o oscilador e os vários processos biológicos cujos ritmos são por ele controlados. Os processos fisiológicos que se apresentam sob controle do relógio circadiano incluem: controle de expressão gênica, níveis iônicos intracelulares, florescimento, movimentos das folhas, abertura dos estômatos, abertura das pétalas, movimentação de cloroplastos e fosforilação proteica (Barak *et al.*, 2000; Anderson & Kay, 1996).

Dentre os genes sob controle deste relógio biológico, os que mais se destacam, pela importância fisiológica e pelo controle de rotas de produção de

metabólitos secundários, são: genes implicados nos processos de consumo, transporte e armazenamento de açúcares produzidos na fotossíntese, que têm seu pico de expressão perto do fim do dia; um grande agrupamento de genes implicados nas reações de coleta de luz para a fotossíntese, que têm sua expressão máxima próxima ao meio do dia, e genes que codificam uma série de enzimas envolvidas na modificação lipídica, que são regulados para ter sua expressão próxima ao anoitecer - o que é consistente com ritmos observados nos níveis de dessaturação de lipídeos da membrana, que são correlacionados com aumento na resistência ao frio durante a noite (Harmer *et al.*, 2000).

1.2. Ácidos Clorogênicos

Compostos fenólicos são substâncias que constituem uma das classes mais comuns e abundantes de metabólitos secundários em plantas. São caracterizados por apresentarem ao menos um anel aromático com um grupo hidroxila (fenóis) ou mais (polifenois) ligados a ele. Dentro deste grande grupo, podem ser observados desde monômeros simples, de baixa massa molecular, até polímeros grandes e complexos. Seus derivados podem ser categorizados de acordo com o número e a disposição dos seus átomos de carbono, tais como: ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, flavonoides, etc. (Crozier *et al.*, 2009; Lattanzio *et al.*, 2006).

Os ácidos clorogênicos são classificados como polifenois não-flavonoidicos, C_6C_3 hidroxicinamatos ou fenilpropanoides. Esta classificação se aplica por serem derivados formados a partir da conjugação dos ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico ou sinapínico) ao ácido quínico, principalmente (Fig. 2). Dentro da classe dos ácidos clorogênicos, os principais subgrupos são os ácidos cafeoilquínicos (Fig. 3) e dicafeoilquínicos, formados a partir da esterificação do ácido quínico com uma ou duas unidades de ácido cafeico, além de ocorrerem também de forma ampla os ácidos feruloilquínicos (Fig. 3), ésteres de ácido quínico com ácido ferúlico. Os ácidos, *p*-cumaroilquínicos (Fig. 3), cafeoil-feruloilquínicos e feruloil-cafeoilquínicos são considerados substâncias minoritárias, mas também podem ser observados em diferentes espécies (Crozier *et al.*, 2009; Campa *et al.*, 2005; Clifford, 2000).

Ácidos Clorogênicos - Nome e abreviação	Substituintes		
	R ₃	R ₄	R ₅
ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (3-CQA)	C	H	H
ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (5-CQA)	H	H	C
ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (4-CQA)	H	C	H
ácido 3- <i>O-p</i> -cumaroilquínico (3- <i>p</i> CoQA)	<i>p</i> -Co	H	H
ácido 5- <i>O-p</i> -cumaroilquínico (5- <i>p</i> CoQA)	H	H	<i>p</i> -Co
ácido 4- <i>O-p</i> -cumaroilquínico (4- <i>p</i> CoQA)	H	<i>p</i> -Co	H
ácido 3- <i>O</i> -feruloilquínico (3-FQA)	F	H	H
ácido 5- <i>O</i> -feruloilquínico (5-FQA)	H	H	F
ácido 4- <i>O</i> -feruloilquínico (4-FQA)	H	F	H
ácido 3,4-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (3,4-diCQA)	C	C	H
ácido 3,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (3,5-diCQA)	C	H	C
ácido 4,5-di- <i>O</i> -cafeoilquínico (4,5-diCQA)	H	C	C

Figura 2. Estruturas do ácido quínico e dos ácidos hidroxicinâmicos precursores dos ácidos clorogênicos. Os ácidos hidroxicinâmicos (substituintes) se conjugam ao ácido quínico em diferentes posições (R₃, R₄ e R₅), formando os ácidos clorogênicos.

Figura 3. Estruturas de ácidos clorogênicos pertencentes aos subgrupos dos ácidos cafeoilquínicos, cumaroilquínicos e feruloilquínicos.

Acredita-se que a produção de fenilpropanoides em diferentes tecidos vegetais seja estimulada, principalmente, pela incidência de raios UV, podendo também ser alterada pela disponibilidade hídrica. Estudos já mostraram que tanto frutas quanto folhas de diferentes espécies apresentam maior concentração destes metabólitos quando expostas por mais tempo ou a uma maior intensidade de radiação solar (Zupan *et al.*, 2014; Fukuoka, *et al.*, 2014; Sampaio *et al.*, 2016). A incidência de raios UV e altas temperaturas influenciam a expressão gênica de enzimas da via biossintética dos fenilpropanoides, como a fanilalanina amônia-liase (PAL), primeira enzima desta via, gerando acúmulo de substâncias C_6C_3 e, conseqüentemente, de ácidos clorogênicos (Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2014; Payyavula *et al.*, 2015; Neugart *et al.*, 2016).

Existem diferentes propostas descrevendo a via biossintética dos ácidos clorogênicos, considerando que estes metabólitos secundários façam parte da via dos fenilpropanoides. Na Figura 4 estão apresentadas três rotas com o ácido 5-cafeoilquínico como produto final (Valiñas *et al.*, 2015). A primeira consiste na esterificação do ácido quínico com *p*-cumaroil-CoA, seguida da hidroxilação do ácido *p*-cumaroilquínico para formar o ácido clorogênico. A segunda rota possui quatro etapas consecutivas: esterificação do ácido chiquímico com *p*-cumaroil-CoA; hidroxilação do *p*-cumaroilchiquimato para formar o ácido cafeoilchiquímico; desesterificação para produzir cafeoil-CoA, que, então, é re-esterificada ao ácido quínico para formar o ácido clorogênico. E, finalmente, na terceira rota, a cafeoil-CoA é sintetizada a partir do ácido *p*-cumárico via ácido cafeico, gerando ácido clorogênico após esterificação com o ácido quínico, como na última etapa da segunda rota (Schoch *et al.*, 2001; Niggeweg *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2005). Diversas enzimas fazem parte das etapas presentes no processo de biossíntese, sendo a hidroxicinamoil-CoA quinato hidroxicinamoil transferase (HQT) e a hidroxicinamoil-CoA chimquimato/quinato hidroxicinamoil transferase (HCT) consideradas as mais importantes para a formação do ácido 5-cafeoilquínico (Payyavula *et al.*, 2015).

Figura 4. Rotas biossintéticas propostas para a produção do ácido 5-cafeoilquínico a partir da via dos fenilpropanoides. Adaptado de Valiñas *et al.*, 2015.

Outros estudos foram desenvolvidos com o intuito de compreender a função dos ácidos clorogênicos nas plantas em que são produzidos. Mondolot e seus colaboradores (2006) observaram a histolocalização dos derivados dos ácidos cafeoil e feruloilquínicos durante o desenvolvimento foliar da espécie *Coffea canephora*. O estudo concluiu que, em folhas jovens, as substâncias se acumulam principalmente nas células do clorênquima. Esta localização pode significar que os ácidos clorogênicos possuem papel protetor (contra estresse oxidativo ou contra danos causados pela incidência de raios UV, por exemplo) nos cloroplastos e/ou que a biossíntese destes metabólitos se dá nestas organelas. Em folhas em desenvolvimento, por sua vez, o acúmulo de derivados dos ácidos clorogênicos foi observado em células do floema. O acúmulo de 5-CQA em feixes vasculares, e mais especificamente no floema primário, apoia a hipótese de que esta substância seja um precursor da lignina, transportado das folhas mais jovens para as mais maduras. Outra investigação, buscando compreender a produção e a atividade de um derivado fenólico, mostrou que o ácido cinâmico, precursor da classe de metabólitos em estudo, deve ser produzido na forma de isômero trans, que não possui atividade na planta, e convertido, por exposição à radiação UV, ao isômero cis, responsável pela iniciação da formação de raízes laterais ao agir como inibidor de efluxo celular de auxina (Steenackers *et al.*, 2017).

Além das atividades biológicas que desempenham nas plantas, os ácidos clorogênicos possuem grande importância econômica: são compostos presentes em diversos vegetais, e podem ser responsáveis por características organolépticas relevantes em determinados alimentos, como, por exemplo, o amargor característico do café após a torragem dos grãos (Campa *et al.*, 2005). Atividades farmacológicas também já foram atribuídas aos ácidos clorogênicos, tanto na ingestão pela dieta, quanto na administração terapêutica. Os principais efeitos do ácido 5-cafeoilquínico relatados são consequência da regulação de vias de sinalização, eliminação de radicais livres e/ou redução da produção de mediadores pró-inflamatórios em diferentes tecidos. Entre as atividades farmacológicas já descritas na literatura, as principais são antioxidante (Ohnishi *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 2011; Iwahashi *et al.*, 1990), anti-inflamatória (Shin *et al.*, 2015; Francisco *et al.*, 2013; Krakauer, 2002; Shin *et al.*, 2015; Hebeda *et al.*, 2011), hepatoprotetora (Shi *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013), neuroprotetora (Kwon *et al.*, 2010; Hara *et al.*, 2014; Qu *et al.*,

2014; Shen *et al.*, 2012), reguladora do metabolismo de glicose e lipídios (De Sotillo & Hadley, 2002; Ong *et al.*, 2013; Mccarty, 2005; Li *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2010), além de antitumoral (Jin *et al.*, 2005; Lee & Zhu, 2006), antiartrítica (Chen *et al.*, 2011; Chauhan *et al.*, 2012) e cardioprotetora (Al-Rasheed *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014).

Diversas espécies e famílias vegetais são conhecidas por produzirem ácidos clorogênicos como alguns dos seus principais metabólitos. Entre as plantas produtoras destas substâncias, muitas são rotineiramente consumidas na dieta humana. Clifford (1999) cita como exemplo bebidas, como café, chá verde e mate, e alimentos, tais como maçã, pera e frutas cítricas, além das hortaliças couve e repolho. Um ponto forte a se destacar da literatura helvética ou da medicina tradicional chinesa, que se utilizam de espécies vegetais ricas em ácidos clorogênicos, são os processos de secagem reportados, similares ao que muito se conhece dos chás. O melhor produto normalmente está relacionado à secagem lenta e, preferencialmente, à sombra, o que pode estar, em hipótese, relacionado ao maior teor desses metabólitos (Ehrman, Barlow & Hylands; 2007, 2010).

1.3. Espécies em estudo

As espécies foram selecionadas de acordo com informações disponíveis na literatura (Clifford, 1999; Marques & Farah, 2009) acerca da produção de metabólitos secundários da classe dos ácidos clorogênicos pelas famílias às quais pertencem.

1.3.1. *Anacardium occidentale* L. (Família Anacardiaceae)

Popularmente conhecida como cajueiro (Fig. 5), é uma árvore de pequeno porte com frutos comumente consumidos na dieta. Tradicionalmente, suas folhas são utilizadas para tratar doenças reumáticas e hipertensão (Andarwulan *et al.*, 2012; Nugroho *et al.* 2013). Atividades antibacteriana (Tan & Chan, 2014), antihiperglicêmica e de proteção renal (Tedong *et al.*, 2006) foram constatadas em suas folhas. Efeito antioxidante foi observado tanto em extrato de folhas (Tan & Chan, 2014) quanto de polpa do pseudofruto e de castanhas de Caju (Trevisan *et al.*, 2006). Um estudo desenvolvido por Dionísio e colaboradores (2015) mostrou que a administração de uma bebida funcional contendo caju e yacon (*Smallanthus sonchifolius*), promoveu

melhora na condição de ratos *Wistar* diabéticos. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de ácidos fenólicos em concentrações significativas nas folhas de cajueiro, aproximadamente 17 mg/100 g de material vegetal fresco (Andarwulan *et al.*, 2012).

Figura 5. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Anacardium occidentale*.

1.3.2. *Annona muricata* L. (Família Annonaceae)

As folhas da graviola (Fig. 6) são utilizadas, na medicina tradicional, no tratamento de dor de cabeça, insônia, cistite, problemas hepáticos, diabetes, hipertensão, além de apresentar atividade anti-inflamatória, antiespasmódica e antidesenteria (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002; Sousa *et al.*, 2004; Lorenzi & Matos, 2008). Pesquisas apontam para um efeito protetor no tecido hepático, contra a estresse oxidativo (Adewole & Ojewole, 2009), efeito anti-hiperglicêmico (Adeyemi *et al.*, 2009), ação antinociceptiva e antiinflamatória (De Sousa *et al.*, 2010), e efeito cicatrizante na pele (Paarakh *et al.*, 2009). Entre as atividades descritas na literatura, as ações antitumoral, antiparasitária e inseticida se apresentam como as mais importantes (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Análise das folhas desta espécie aponta a presença de ácidos clorogênicos em concentrações próximas a 55 mg/100 g de material vegetal seco (Marques & Farah, 2009), enquanto a polpa da fruta pode apresentar cerca de 47 mg de ácidos clorogênicos por 100 g de material vegetal seco (Pontes, *et al.*, 2002).

Figura 6. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Annona muricata*.

1.3.3. *Bauhinia variegata* L. (Família Fabaceae)

Diferentes partes das plantas desta espécie são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de úlceras, doenças de pele, condições inflamatórias, bronquite e como antídoto para veneno de cobras (Jan *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2008; Kirtikar & Basu, 1993). Estudos desenvolvidos com a Pata-de-Vaca (Fig. 7), seu nome popular, apontam para diversas ações biológicas, entre elas: antibacteriana (Parekh *et al.*, 2009), imunomodulatória (Ghaisas *et al.*, 2009) e antitumoral (Raj Kapoor *et al.*, 2003b). Observou-se, ainda, ação antioxidante (Mishra *et al.*, 2013) e antiulcera (Raj Kapoor *et al.*, 2003a), esta última dando embasamento ao seu uso tradicional. Pertencendo à família Fabaceae, descrita por Clifford (1999) como uma das produtoras de metabólitos secundários da classe dos ácidos clorogênicos, espera-se que a *B. variegata* também produza estas substâncias.

Figura 7. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Bauhinia variegata*.

1.3.4. *Citrus limon* (L.) Burm. f. (Família Rutaceae)

O limão (Fig. 8) é conhecido por ser uma importante fonte de diferentes componentes químicos naturais, especialmente polifenóis do tipo flavonoides, produzindo, também, ácidos clorogênicos (Del Río *et al.*, 2004; González-Molina *et al.*, 2010). As substâncias presentes no limão possuem ação benéfica sobre doenças cardiovasculares e coronárias, câncer, obesidade e sobre o metabolismo de lipídios (González-Molina *et al.*, 2010). Foram observadas, ainda, atividade antioxidante no extrato das sementes (Luzia & Jorge, 2009) e atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L. no óleo essencial (Furtado *et al.*, 2005).

Figura 8. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Citrus limon*.

1.3.5. *Coffea arabica* L. (Família Rubiaceae)

O café (Fig. 9) é uma das bebidas mais consumidas ao redor do mundo, e para muitas pessoas representa a principal fonte de ácidos clorogênicos da dieta – podem estar presentes de 20 a 675 mg desta substância em cada porção de 200 mL da bebida (Clifford, 1999). Tradicionalmente, diferentes partes do cafeeiro são usadas para o tratamento de gripe, anemia, edema, astenia, raiva, hepatite e problemas hepáticos, além de ser utilizado como estimulante, antitussígeno e cardiotônico (Bisht & Sosidia, 2010). O potencial antioxidante do café também é bastante conhecido, e normalmente é associado à presença do ácido 5-cafeoilquínico (Abrahão *et al.* 2010; Daglia *et al.* 2000). Além desta atividade, foram estudados, também seu potencial anti-inflamatório (Chandra, *et al.*, 2012), antimicrobiano (Daglia, *et al.*, 1994) e fotoprotetor, contra o envelhecimento da pele (Chiang, *et al.* 2011).

Figura 9. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Coffea arabica*.

1.3.6. *Eugenia uniflora* L. (Família Myrtaceae)

Mais conhecida como Pitanga (Fig. 10), esta planta vem sendo utilizada como anti-hipertensivo, diurético, adstringente, antipirético, antirreumático, e no tratamento de doenças digestivas, além de suas folhas serem utilizadas em casos de bronquite, gripe e problemas intestinais (Consolini & Sarubbio, 2002). Um estudo, buscando dar base ao uso empírico desta planta nos casos de hipertensão, comprovou ação hipotensiva e diurética do extrato aquoso das folhas (Consolini *et al.*, 1999). Foram demonstradas, também, atividades antioxidante, antimicrobiana (Victoria *et al.*, 2012), citotóxica (Ogunwande *et al.*, 2005), além de melhoras em quadros de diabetes e obesidade através da redução da hiperglicemia pós-prandial e da hipertrigliceridemia (Arai *et al.*, 1999).

Figura 10. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Eugenia uniflora*.

1.3.7. *Rosmarinus officinalis* L. (Família Lamiaceae)

Popularmente chamada de alecrim (Fig. 11), esta erva pertence à família Lamiaceae, conhecida por produzir polifenóis, mais especificamente ésteres do ácido cafeico, como metabólitos secundários (Clifford, 1999). Na medicina tradicional, seu uso já foi descrito para diversos tratamentos, como para doenças inflamatórias, fadiga física e mental, histeria e depressão (Machado *et al.*, 2012). Seu óleo essencial apresenta atividade antioxidante, hepatoprotetora (Manzo *et al.*, 2016; Rašković *et al.*, 2014) e bactericida para a espécie *Clostridium perfringens*, podendo ser usado como conservante de alimentos (Radaelli *et al.*, 2016). Além disso, suas atividades hipoglicêmica e hipolipidêmica podem estar ligadas à capacidade de inibição das enzimas lipase sensível a hormônio (HSL) e lipase pancreática (PL), de maneira dose-dependente (Bustanji *et al.*, 2010). Ácidos clorogênicos foram observados no extrato etanólico das folhas secas, que auxiliou na prevenção de úlceras gástricas em estudos *in vivo* (Pires *et al.*, 2013).

Figura 11. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Rosmarinus officinalis*.

1.3.8. *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Família Myrtaceae)

Na medicina tradicional, o jambolão (Fig. 12), como é popularmente conhecido, é utilizado contra disenteria, inflamação e diabetes mellitus (Shafi *et al.*, 2002). As folhas também são usadas para fortalecer os dentes e a gengiva, e para tratar leucorreia, dores de estômago, febre, gastropatias, dermatopatias, constipação e sangue nas fezes (Warrier *et al.*, 1996; Bhandary *et al.*, 1995). Em estudos *in vitro*, a casca da fruta apresentou atividade antioxidante (Banerjee *et al.*, 2005), assim como o extrato metanólico das folhas, com comprovação da relação direta entre esta

atividade e a presença de ácidos clorogênicos (Guleria *et al.*, 2013). O suco, a polpa congelada e uma bebida alcoólica fermentada produzida a partir da fruta também apresentaram importante atividade antioxidante (Coelho *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016). O extrato da folha demonstrou ter, ainda, efeito antibacteriano (Gowri & Vasantha, 2010), assim como o óleo essencial (Shafi *et al.*, 2002). Atividade antiinflamatória foi observada no extrato da casca da árvore (Muruganandan *et al.*, 2001). Estudos apontam para a hipótese de que o extrato aquoso das folhas e da semente tem ação sobre a enzima adenosina desaminase (ADA), influenciando processos imunológicos e inflamatórios em diferentes tecidos (Abdalla *et al.*, 2011; De Bona *et al.*, 2014; De Bona *et al.*, 2016). Marques & Farah (2009) quantificaram ácidos clorogênicos no extrato metanólico de folhas da espécie, encontrando cerca de 20 mg desta classe de metabólitos secundários por 100 g de material vegetal seco.

Figura 12. Fotos das folhas de um indivíduo da espécie *Syzygium cumini*.

1.4. Utilização de sistemas acoplados na identificação e quantificação de metabólitos secundários

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é reconhecida, desde o início dos anos 80, como a técnica mais versátil para a separação de produtos naturais a partir de amostras brutas ou frações. Geralmente as separações são realizadas em fase reversa, com fase estacionária C18, metanol:água ou acetonitrila:água como fases móveis, e em modo gradiente. A CLAE pode ser aplicada tanto para fins de análise qualitativa, quanto quantitativa, e é bastante

utilizada no controle de qualidade de produtos naturais (Wolfender, 2009).

Com o passar do tempo e a necessidade de se obter análises mais rápidas e mais eficientes, iniciou-se a busca por novas alternativas, como a utilização de colunas cromatográficas mais curtas, o aumento da vazão da fase móvel, a aplicação de altas temperaturas ($>60^{\circ}\text{C}$) na coluna, a utilização de colunas monolíticas (que apresentam uma estrutura diferenciada, com maior permeabilidade à fase móvel) e a utilização fases estacionárias com partículas reduzidas ($2\text{ }\mu\text{m}$) em sistemas cromatográficos convencionais. Porém, a aplicação destes novos parâmetros teve como consequência a redução de resolução e desempenho cromatográfico, risco de degradação de analitos e dificuldades na obtenção de colunas e equipamentos adequados. Assim, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) foi desenvolvida para contornar essas dificuldades, utilizando colunas mais curtas, com partículas menores que $2\text{ }\mu\text{m}$ e sistemas capazes de trabalhar em pressões maiores, de 100 MPa (15000 psi). Com isso, foram alcançados: altíssimo desempenho cromatográfico, análises até 20 vezes mais rápidas e grande redução na utilização de solventes orgânicos, o que torna o processo menos poluente (Maldaner & Jardim, 2009; Cielecka-Piontek *et al.*, 2013).

Diferentes técnicas cromatográficas podem ser acopladas a diferentes analisadores. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM) combina as maiores vantagens das duas técnicas: alta seletividade, eficiência de separação e obtenção de informações estruturais (massa e fórmula molecular, fragmentos) (Vékey, 2001). A evolução de sistemas robustos acoplados, como CL-EM e CL-RMN, para a detecção, quantificação e/ou identificação dos compostos representa um dos progressos recentes mais importantes da química analítica. O uso destes sistemas pode tornar dispensável a etapa de isolamento fitoquímico dos compostos, que exige grande desprendimento de tempo e conhecimento acerca de técnicas específicas, como a cromatografia em coluna e/ou preparativa. Além disso, a utilização da CL-EM na separação e caracterização de metabólitos a partir de matrizes complexas garante alta seletividade e sensibilidade (Wilson & Brinkman, 2007; Wolfender, 2009).

Inicialmente, um dos grandes desafios no acoplamento das técnicas de separação e detecção era a incompatibilidade entre os altos fluxos de saída de

líquido da coluna cromatográfica e o alto vácuo empregado nos detectores de espectrometria de massas. Para superar esta dificuldade, foram desenvolvidas fontes de ionização que operam a pressão atmosférica, como a ionização química a pressão atmosférica (APCI – *atmospheric pressure chemical ionisation*) e a ionização por eletrospray (ESI – *electrospray ionisation*). Na ESI, um campo de alta voltagem (3 a 5 kV) é aplicado em um capilar através do qual é realizada a nebulização do fluxo efluente da coluna, resultando em gotas carregadas. A evaporação do solvente diminui o tamanho destas gotas, até que a tensão superficial seja reduzida a ponto de liberar os íons gerados, que serão direcionados ao analisador (Wolfender, 2009). Neste tipo de ionização, podem ocorrer três diferentes reações que culminam na formação de três tipos distintos de espécies carregadas: as reações redox (redução/oxidação) geram os íons moleculares (M^{+}) ou (M^{-}); as reações ácido/base geram moléculas protonadas ou desprotonadas ($[M+H]^{+}$ ou $[M-H]^{-}$), e as reações de coordenação com cátion ou ânions geram espécies cationizadas ($[M+Na]^{+}$, $[M+K]^{+}$) ou anionizadas ($[M+Cl]^{-}$) (Crotti *et al.*, 2006).

Existem, também, diversos tipos de analisadores de massas que podem ser utilizados de acordo com as necessidades de cada análise. O quadrupolo é um analisador de baixa resolução, no qual quatro hastes de metal carregadas são dispostas paralelamente, a mesma distância, com voltagens opostas entre os pares horizontal e vertical. A diferença entre as voltagens gera um campo elétrico no qual a molécula carregada a ser analisada (de relação massa/carga pré-determinada) irá se deslocar em movimento oscilatório bidimensional constante até chegar ao detector (Ho *et al.*, 2003). O analisador do tipo *ion trap*, por sua vez, é considerado um análogo tridimensional do analisador quadrupolar (Wong & Cooks, 1997). É composto de três eletrodos hiperbólicos: um eletrodo em anel, um eletrodo de tampa terminal (“*end-cap*”) de entrada e um eletrodo de tampa terminal de saída, aos quais são aplicadas diferentes voltagens, gerando um campo elétrico em que os íons são aprisionados e analisados de acordo com sua relação massa/carga. Durante a detecção, o potencial do sistema é alterado, gerando instabilidade na trajetória dos íons, que são ejetados em direção ao sistema detector (Ho *et al.*, 2003).

Para a obtenção de detecção mais específica, informações estruturais mais detalhadas das moléculas e consequente elucidação estrutural dos compostos, pode

ser utilizada a espectrometria de massas em sequência (EM/EM ou EMⁿ). Nesta técnica, o íon precursor de interesse é selecionado, fragmentado, e seus fragmentos são, também, reconhecidos. O analisador do tipo *ion trap* é capaz de realizar este tipo de análise: um gás inerte é introduzido na cavidade formada dentro dos eletrodos, colidindo com o íon precursor, gerando os fragmentos que são, por sua vez, direcionados ao detector. Outro exemplo deste modelo de instrumentação é o triplo-quadrupolo (TQD). Como o nome sugere, neste equipamento três quadrupolos estão dispostos linearmente, em sequência, em um mesmo sistema de vácuo: o primeiro analisador (Q1) isola o íon precursor de interesse; o segundo (Q2) atua como uma célula de colisão e gera fragmentos, e o terceiro (Q3) analisa os fragmentos obtidos. Na célula de colisão, a espécie isolada em Q1 é ativada a partir da colisão das moléculas com um gás inerte, e fragmentada. Este processo leva o nome de dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*) (Ho *et al.*, 2003; Ardrey, 2003; Wolfender, 2009).

Diferentes modos de obtenção de dados podem ser selecionados quando utilizado o analisador triplo-quadrupolo. Geralmente, para fins de quantificação, aplica-se o modo MRM (*multiple reaction monitoring*), que monitora a presença da transição íon precursor/íon fragmento pré-determinada (Ho *et al.*, 2003). O modo MRM garante alta seletividade, ao analisar apenas moléculas de razão *m/z* específicas da substância em análise, e alta sensibilidade, uma vez que Q1 isola a substância de interesse, reduzindo a presença de possíveis interferentes da amostra (Domon & Aebersold, 2006). Estas características favorecem a utilização desta técnica na análise de produtos naturais, geralmente provenientes de matrizes complexas.

1.5. Validação

Segunda a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação de um método analítico consiste na confirmação objetiva de que este método atende requisitos específicos para o uso pretendido. Assim, a fim de verificar a adequação do método desenvolvido às análises necessárias, podem ser avaliados parâmetros como Linearidade e Intervalo. A Linearidade é definida como a capacidade de um método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à

concentração de analito na amostra, dentro de uma determinada faixa de trabalho. O Intervalo, por sua vez, normalmente é derivado do estudo de Linearidade, e é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta Exatidão e Precisão adequadas quando aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado. A Repetibilidade é considerada um nível de Precisão, e avalia a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação (ANVISA, 2003).

5. Conclusão

Com base nas análises realizadas foi possível concluir que os métodos analíticos utilizados mostraram-se eficazes para o desenvolvimento do trabalho e obtenção dos dados qualitativos e quantitativos. O desenho experimental planejado foi satisfatório, com coletas, indivíduos e réplicas suficientes para a realização das análises estatísticas necessárias.

Em relação à quantificação de ácidos clorogênicos, foi possível constatar que os indivíduos das espécies Café e Pitanga apresentam as maiores concentrações destas substâncias em suas folhas. Observou-se, ainda, que não há um acúmulo significativo dos compostos em estudo até duas horas após a coleta, e que as espécies observadas não mostram um padrão de variação na concentração das substâncias de interesse neste intervalo.

Ao observar um espaço de tempo mais amplo, por outro lado, foi constatado o acúmulo de diversos compostos analisados em indivíduos das espécies Alecrim, Café, Limão e Pitanga. Estes resultados corroboram a hipótese de que os ácidos clorogênicos são produtos do metabolismo secundário vegetal e, também, podem ser gerados a partir de catabolismo de substâncias de maior massa molecular após o início do processo de morte tecidual. As ligninas podem ser uma das macroestruturas que geram compostos C_6C_3 a partir de sua decomposição, porém os mecanismos que amparam a produção dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos no catabolismo não foram esclarecidos e abrem uma nova perspectiva de investigação.

6. Referências Bibliográficas

- ABDALLA, F. H. *et al.* Protective effects of *Syzygium cumini* seed extract against methylmercury-induced systemic toxicity in neonatal rats. **BioMetals**, v. 24, n. 2, p. 349–356, 2011.
- ABRAHÃO, S. A. *et al.* Coffee (*Coffea arabica* L.) bioactive compounds and antioxidant activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414–420, 2010.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 30–41, 2009.
- ADEYEMI, D. O. *et al.* Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 1, p. 62–69, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, DF, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA). **Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. Brasília, DF, 2017.
- AL-RASHEED, N. M. *et al.* Potential impact of silymarin in combination with chlorogenic acid and/or melatonin in combating cardiomyopathy induced by carbon tetrachloride. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 265–274, 2014.
- ANDARWULAN, N. *et al.* Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 339–347, 2012.
- ANDERSON, S. L.; KAY, S. A. Illuminating the mechanisms of the circadian clock in plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 2, p. 51–57., 1996.
- ARAI, I. *et al.* Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 307–314, 1999.
- ARDREY, R. E., **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. Editora Wiley, Inglaterra, 2003.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727–733, 2005.
- BARAK, S. *et al.* All in good time: The Arabidopsis circadian clock. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 517–522, 2000.

BATES, D.; MAECHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n. 1, p. 1-48, 2015.

BHANDARY, M. J.; CHANDRASHEKAR, K. R.; KAVERIAPPA, K. M. Medical ethanobotany of the siddis of Uttara Kannada district, Karnataka, India. **Journal of Ethanopharmacology**, v. 47, p.149-158, 1995.

BISHT, S.; SISODIA, S. *Coffea arabica*: A wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 58–65, 2010.

BOURGAUD, F. *et al.* Production of plant secondary metabolites : a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839–851, 2001.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of Plant Age , Genotype and Herbivory on Plantago Performance and Chemistry. **Ecology**, v. 74, n. 6, p. 1778–1791, 1993.

BUSTANJI, Y. *et al.* Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 21, p. 2235–2242, 2010.

CAMPA, C. *et al.* Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild Coffea species. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 135–139, 2005.

CHANDRA, S. *et al.* Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S178–S180, 2012.

CHAUHAN, P. S. *et al.* Differential effects of chlorogenic acid on various immunological parameters relevant to rheumatoid arthritis. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 8, p. 1156–1165, 2012.

CHEN, W. P. *et al.* Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1 β -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 23–28, 2011.

CHIANG, H. M. *et al.* *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 309–318, 2011.

CHO, A. S. *et al.* Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937–943, 2010.

CIELECKA-PIONTEK, J. *et al.* UHPLC: The greening face of liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 76, n. 21–22, p. 1429–1437, 2013.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362–372, 1999.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. October 1999, p. 1033–1043, 2000.

CLIFFORD, M. N. *et al.* LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v. 106, p. 379–385, 2008.

COELHO, E. M. *et al.* Phenolic Profile, Organic Acids and Antioxidant Activity of Frozen Pulp and Juice of the Jambolan (*Syzygium cumini*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 211–219, 2016.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 57–63, 2002.

CONSOLINI, A.; BALDINI, O.; AMAT, A. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 33–39, 1999.

CROTTI, A. E. M. *et al.* Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CROZIER, A. *et al.* Dietary phenolics : chemistry , bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

DAGLIA, M. *et al.* In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1449–1454, 2000.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2270–2272, 1994.

DE BONA, K. S. *et al.* Protective effect of gallic acid and *Syzygium cumini* extract against oxidative stress-induced cellular injury in human lymphocytes. **Drug Chem Toxicol**, v. 39, n. 3, p. 256–263, 2016.

DE BONA, K. S. *et al.* *Syzygium cumini* is more effective in preventing the increase of erythrocytic ADA activity than phenolic compounds under hyperglycemic conditions in vitro. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 321–330, 2014.

DE SOTILLO, D. V. R.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 717–726, 2002.

DE SOUSA, O. V. *et al.* Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 5, p. 2067–2078, 2010.

DEL RÍO, J. A. *et al.* Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chemistry**, v. 84, p. 457–461, 2004.

DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural product reports**, v. 33, n. 3, p. 432–55, 2016.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**, Editora UNESP, 2ª edição, p. 87-112, 2002.

DIONÍSIO, A. P. *et al.* Cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) functional beverage improve the diabetic state in rats. **Food Research International**, v. 77, p. 171–176, 2015.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212–217, 2006.

EHRMAN, T. M.; BARLOW, D. J.; HYLANDS, P. J. Virtual Screening of Chinese Herbs with Random Forest. **J. Chem. Inf. Model**, n. 1, p. 264–278, 2007.

EHRMAN, T. M.; BARLOW, D. J.; HYLANDS, P. J. Bioorganic & Medicinal Chemistry In silico search for multi-target anti-inflammatories in Chinese herbs and formulas. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2204–2218, 2010.

ESCAMILLA-TREVIÑO, L. L. *et al.* Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Plant Molecular Biology**, v. 84, n. 4–5, p. 565–576, 2014.

FRANCISCO, V. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor-κB pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 126–134, 2013.

FUKUOKA, N. *et al.* Effect of shading on anthocyanin and non-flavonoid polyphenol biosynthesis of *Gynura bicolor* leaves in midsummer. **HortScience**, v. 49, n. 9, p. 1148–1153, 2014.

FURTADO, R. F. *et al.* Atividade larvica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843–847, 2005.

GHAISAS, M. M.; SHAIKH, S. A.; DESHPANDE, A. D. Evaluation of the immunomodulatory activity of ethanolic extract of the stem bark of *Bauhinia variegata* Linn. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 70–74, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1193–1204, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GONZÁLEZ-MOLINA, E. *et al.* Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 327–345, 2010.

GOWRI, S. S.; VASANTHA, K. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1569–1573, 2010.

GULERIA, S. *et al.* In vitro antioxidant activity and phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 9–15, 2013.

HARA, K. *et al.* Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, n. 1, p. 459–464, 2014.

HARMER, S. L. *et al.* Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5499, p. 2110–2113, 2000.

HEBEDA, C. B. *et al.* Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 261–269, 2011.

HO, C. S. *et al.* Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003.

INOSTROZA-BLANCHETEAU, C. *et al.* Effects of UV-B radiation on anatomical characteristics, phenolic compounds and gene expression of the phenylpropanoid pathway in highbush blueberry leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 85–95, 2014.

IWAHASHI, H.; ISHII, T.; SUGATA, R.; KIDO, R. The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 276, p. 242–247, 1990.

JAN, S.; KHAN, M. A.; SIRAJ-UD-DIN, MURAD, W., HUSSAIN, M.; GHANI, A. Herbal remedies used for gastrointestinal disorders in Kaghan valley, NWFP, Pakistan. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v. 14, p. 169–200, 2008.

Jl, L. *et al.* Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1911–1919, 2013.

JIN, U. H. *et al.* A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, n. 22, p. 2760–2769, 2005.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D. **Indian Medicinal Plants, vol. II**. International Book Publisher, Dehradun, p.898–900, 1993.

KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 113-119, 2002.

KWON, S. H. *et al.* Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1–3, p. 210–217, 2010.

LATTANZIO, V. *et al.* Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects in: **Phytochemistry: Advances in Research**. Editora Research Signpost, India, 2006.

LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 2, p. 269–277, 2006.

LI, S.-Y. *et al.* Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- α in golden hamsters fed on high fat diet. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 22, n. 2, p. 122–9, 2009.

LI, Y. *et al.* Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced hypertrophy in neonatal rat myocytes. **Toxicology Letters**, v. 226, n. 3, p. 257–263, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas, Instituto Plantarum: Nova Odessa**, Brasil, 2ª edição, p.62-63, 2008.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 946–949, 2009.

MA, R. *et al.* AP2/ERF Transcription Factor, li049, Positively Regulates Lignan Biosynthesis in *Isatis indigotica* through Activating Salicylic Acid Signaling and Lignan/Lignin Pathway Genes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. August, p. 1–16, 2017.

MACHADO, D. G. *et al.* *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 158–169, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MANZO, L. P. *et al.* Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1–5, 2016.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370–1376, 2009.

MARTUCCI, M. E. P. *et al.* Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: Application in the genus *Vernonia* Schreb. PLoS ONE, v. 9, n. 4, 2014.

MATSUDA, F. *et al.* Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 454–466, 2005.

MCCARTY, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses*, v. 64, n. 4, p. 848–853, 2005.

MISHRA, A. *et al.* *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. *et al.* *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 2015.

MONDOLOT, L. *et al.* Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, v. 98, n. 1, p. 33–40, 2006.

MORREEL, K. *et al.* Mass Spectrometry-Based Sequencing of Lignin Oligomers. **Plant Physiology**, v. 153, n. 4, p. 1464–1478, 2010.

MURUGANANDAN, S. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 369–375, 2001.

NEUGART, S.; KRUMBEIN, A.; ZRENNER, R. Influence of Light and Temperature on Gene Expression Leading to Accumulation of Specific Flavonol Glycosides and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. March, 2016.

NIGGEWEG, R.; MICHAEL, A. J.; MARTIN, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 746–754, 2004.

NUGROHO, A. E.; MALIK, A.; PRAMONO, S. Total phenolic and flavonoid contents, and invitro anti-hypertension activity of purified extract of Indonesian cashew leaves (*Anacardium occidentale* L.). **International Food Research Journal**, v. 20, p.299–305, 2013.

OGUNWANDE, I. A. *et al.* Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. International Journal of **Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, 2005.

OHNISHI, M. *et al.* Inhibitory Effects Of Chlorogenic Acids On Linoleic-Acid Peroxidation And Hemolysis. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 579–583, 1994.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Bioactive composition and sensory evaluation of blended jambolan (*Syzygium cumini*) and sugarcane alcoholic fermented beverages. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 719–728, 2016.

ONG, K. W.; HSU, A.; TAN, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1341–1351, 2013.

PAARAKH, P. M.; CHANSOURIA, J. P. N.; KHOSA, R. L. Wound healing activity of *Annona muricata* extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 3, p. 404–406, 2009.

PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 1, p. 53–57, 2009.

PAVARINI, D. P. *et al.* Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5–16, 2012.

PAYYAVULA, R. S. *et al.* Synthesis and regulation of chlorogenic acid in potato: Rerouting phenylpropanoid flux in HQT-silenced lines. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 4, p. 551–564, 2015.

PIRES, G. *et al.* Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 48–55, 2013.

PONTES, P. V. *et al.* The content of chlorogenic acids in tropical fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 10, p. 1177–1181, 2002.

QU, Z.W. *et al.* Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience letters**, v. 567, p. 35–9, 2014.

RADAELLI, M. *et al.* Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 424–430, 2016.

RAJKAPOOR, B. *et al.* Anti-ulcer effect of *Bauhinia variegata* Linn. in rats. **Journal of Natural Remedies**, v. 3, n. 2, p. 215–217, 2003a.

RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; MURUGESH, N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 107–109, 2003b.

RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; TZENG, Y.-M. . Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. **Phytotherapy Res**, v. 22, n. 7, p.957–962, 2008.

RAŠKOVIĆ, A. *et al.* Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 225, 2014.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; DA COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia* : a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

SATO, Y. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 136–138, 2011.

SCHOCH, G. *et al.* CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36566–36574, 2001.

SHAFI, P. M. *et al.* Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oils. *Fitoterapia*, v. 73, p. 414–416, 2002.

SHEN, W., QI, R., ZHANG, J., WANG, Z., WANG, H., HU, C. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. **Brain Res. Bull.**, v. 88, n. 5, p. 487–494, 2012.

SHI, H. *et al.* Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, n. 1–3, p. 119–124, 2009.

SHIN, H. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. **Food Chemistry**, v. 168, p. 167–175, 2015.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADOS, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes Químicos Ativos e Propriedades Biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras**, Editora UFC, 2ª edição, p 281-283, 2004.

STEENACKERS, W. *et al.* cis-Cinnamic Acid Is a Novel, Natural Auxin Efflux Inhibitor That Promotes Lateral Root Formation. **Plant physiology**, v. 173, n. 1, p. 552–565, 2017.

TAN, Y. P.; CHAN, E. W. C. Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*. **Food Bioscience**, v. 6, p. 17–23, 2014.

TEDONG, L. *et al.* Antihyperglycemic and renal protective activities of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) leaves in streptozotocin induced diabetic rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 2006.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188–197, 2006.

VALIÑAS, M. *et al.* Chlorogenic Acid Biosynthesis Appears Linked with Suberin Production in Potato Tuber (*Solanum tuberosum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 19, p. 4902–4913, 2015.

VALIÑAS, M. A. *et al.* Chlorogenic acid, anthocyanin and flavan-2-ol biosynthesis in flesh and skin of Anderon potato tubers (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*). **Food Chemistry**, v. 229, p. 837–846, 2017.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227–236, 2001.

VICTORIA, F. N. *et al.* Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.

WARRIER, P. K.; NAMBIAR, V. P. K.; RAMANKUTTY, C. Indian Medicinal Plants. **Orient Longaman LTD.**, p.225-228, 1996.

WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. T. Hype and hypernation: multiple hyphenation of column liquid chromatography and spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, 2007.

WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: The detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719–734, 2009.

WONG, P. S. H.; COOKS, R. G. Ion Trap Mass Spectrometry. **Current Separations**, v. 16, p. 85–92, 1997.

YUN, N.; KANG, J.-W.; LEE, S.-M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 1249–1255, 2012.

ZUPAN, A. *et al.* Individual phenolic response and peroxidase activity in peel of differently sun-exposed apples in the period favorable for sunburn occurrence. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 18, p. 1706–1712, 2014.